



**Kitartó képletek (turion) képződése, mint stressz-elkerülő
stratégia vizsgálata bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.)
Schleiden) modell-rendszerben**

Hepp Anna

DE TTK

II. évf. Biotechnológia MSc

Témavezetők:

Dr. Mészáros Ilona

egyetemi docens

Dr. Oláh Viktor

egyetemi adjunktus

**Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar
Növénytani Tanszék**

**XXXII. OTDK Biológia Szekció
2015**

1. BEVEZETÉS	3
2.1. A bojtos békalencse (<i>Spirodela polyrhiza</i> (L.) Schleiden) jellemzői	4
2.1.1. A <i>S. polyrhiza</i> telelőrügek felépítése	6
2.1.2. Telelőrügek létrehozása	6
2.2. A nehézfémek előfordulása a felszíni vizekben, és hatásaik a növényi szervezetben	8
2.3. A békalencse fajok alkalmazása nehézfémek hatásainak a kimutatására	9
3. CÉLKITŰZÉSEK	11
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	12
4.1. A tesztnövények	12
4.2. A kísérleti körülmények	12
4.2.1. A kifejlett növényekkel végzett kísérletek	12
4.2.2. A telelőrügekkel végzett kísérletek	13
4.3. A vizsgálatok eredményének feldolgozása, értékelése	14
5. EREDMÉNYEK	15
5.1. Nikkel-kezelések	15
5.1.1. Nikkel-kezelések hatása a <i>S. polyrhiza</i> tenyészetek növekedésére	15
5.1.2. Nikkel-kezelések hatása a telelőrügek felúszására és kihajtására	18
5.2. Kadmium-kezelések	20
5.2.1. Kadmium-kezelések hatása a <i>S. polyrhiza</i> tenyészetek növekedésére	20
5.2.2. Kadmium-kezelések hatására telelőrügy képződés indult	21
5.2.3. Kadmium-kezelések hatása a telelőrügek felúszására és kihajtására	22
6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	25
6.1. A <i>S. polyrhiza</i> aktív életszakaszának vizsgálata	25
6.2. A telelőrügy-képződés indukciója	25
6.3. A telelőrügek vizsgálata	26
7. ÖSSZEFOGLALÁS	29
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31
9. IRODALOMJEGYZÉK	32

1. Bevezetés

Számos vízinövényfaj életmenetében megfigyelhető, hogy a kedvezőtlen időszakok (alacsony hőmérséklet, fény-, tápanyaghiány) átvészelésére vegetatív propagulumokat képeznek. Ezeknek nagy része a vízfénék közelében marad, vagy oda süllyed le, ahol nyugalmi állapotban sokáig életképesek maradnak, majd a kedvező körülmények visszatértével újra aktiválódnak. A vegetatív propagulumoknak fontos szerepük van a vízi ökoszisztémák fenntartásában, nemcsak a növények áttelelését segítik, hanem a terjedésüket és új élőhelyek kolonizációját is. A vegetatív propagulumokon alapuló, stresszt elkerülő stratégia kiváltó okairól, adott környezeti feltételek között a sikerességéről és a kitartó képletek szennyező anyagokkal szembeni toleranciájáról kevés ismerettel rendelkezünk.

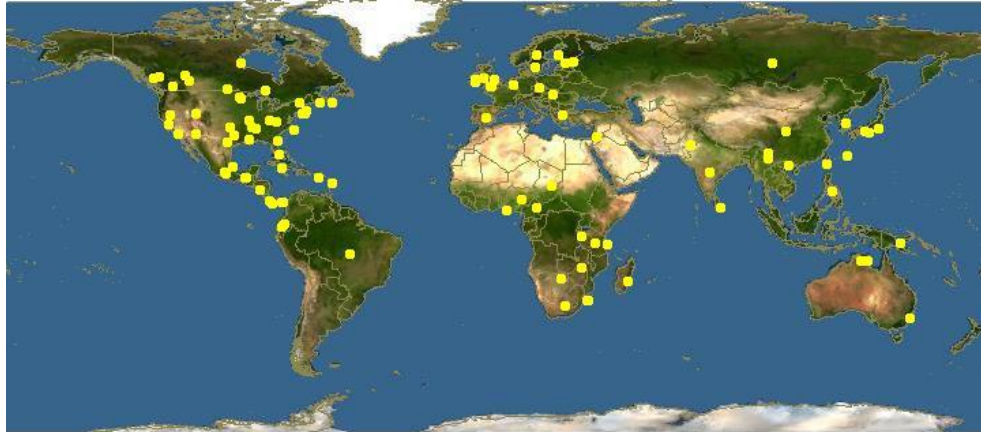
A bojtos békalevél (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amelyek alkalmas modellnövényé teszik a növényélettani, ökofiziológiai, ökotoxikológiai kutatásokban. Életmenetének része, hogy hideg, vagy tápelem-hiány hatására kitartó képleteket, úgynevezett telelőrügyeket képez, emiatt a vegetatív propagulumok viselkedésének vizsgálatára is alkalmas tesztnövény.

Az antropogén hatások eredményeként egyre több szennyező anyag kerül a vizekbe, melyek komoly szennyezéseket okozhatnak. Az egyik legveszélyesebb csoport a nehézfémeké, melyek a felszíni vizekbe kerülve nem bomlanak le, más anyagokkal reagálva pedig akár még veszélyesebb vegyületeket képeznek, és könnyen felhalmozódhatnak. Ilyen nehézfémek például a kadmium és a nikkel, melyek azon túl, hogy a vízben magas koncentrációban lehetnek jelen, vegyületeik lerakódhatnak és felhalmozódhatnak a víz-üledék határfelületén, vagy az üledék felsőbb rétegeiben.

Feltételezhető, hogy szennyezett vizekben, a vízfelszínen úszó növényekhez képest a vízfénékre süllyedő, de sokáig életképes propagulumoknak sokkal hosszabb ideig, és esetleg magasabb toxinkoncentrációt kell elviselniük. A toxikus hatásokkal szemben a telelőrügyek lelassult anyagcseréje azonban bizonyos mértékig védelmet is jelenthet. A vízinövényekre kidolgozott ökotoxikológiai tesztekben általában a fiziológiailag aktív életszakaszok szennyező anyagokra adott válaszreakcióit vizsgálják. Ezzel szemben a dormans vegetatív propagulumoknak a toxikus vegyületekkel szembeni érzékenységről keveset tudunk, pedig a vizsgálatuk környezetvédelmi, ökológiai és ökofiziológiai szempontból is fontos és érdekes adatokat eredményezhetne.

2. Irodalmi áttekintés

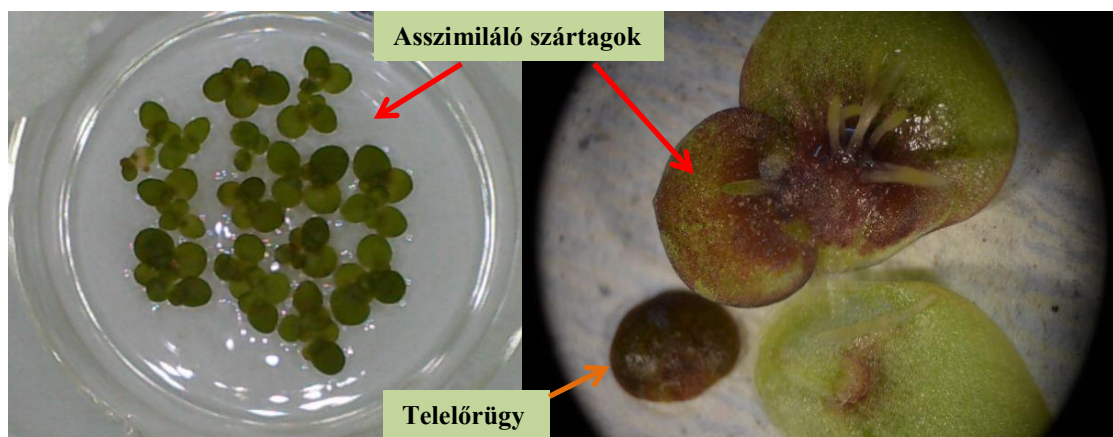
A békalencse fajok (*Lemnaceae*, *Araceae*) álló vagy lassan folyó vizek felszínén lebegő, redukált felépítésű, egyszikű növények. A sarkvidékek és a sivatagok kivételével az egész világon elterjedtek (1. ábra). A békalencsék családjába jelenleg 5 nemzetség 38 fajt sorolják (Les et al. 2002).



1. ábra A bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) eddig leírt előfordulási helyei. Encyclopedia of Life (www.eol.org)

2.1. A bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) jellemzői

A bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) a *Lemnaceae* család egyik legnagyobb termetű képviselője. A szártagokban aerenchima található, ami lehetővé teszi, hogy a szártagok a víz felszínén lebegjenek, magányosan, vagy 2-5 összenőve. A szártagok alakja lehet ovális, vagy majdnem kerek. A szártagok felszíne zöld, míg fonákjuk általában lilás-piros a felhalmozott antocián miatt, de mindkét felszín lapos (1. kép).



1. kép A tesztekhez használt axenikus *Spirodela polyrhiza* tenyészet felülnézeti képe (balra), illetve a szártagok fonákja és egy telelőrügy (jobbra) (a Szerző felvétele)

Jellemzően vegetatívan szaporodnak, de ritkán a szártag két oldalsó merisztémájából apró, egynemű virágok bújhatnak elő. A virágzási időszak nyár elején, vagy kora ősszel van. Gyökérzetük több, 10-13 (2-18) gyökérből álló gyökércsomó.

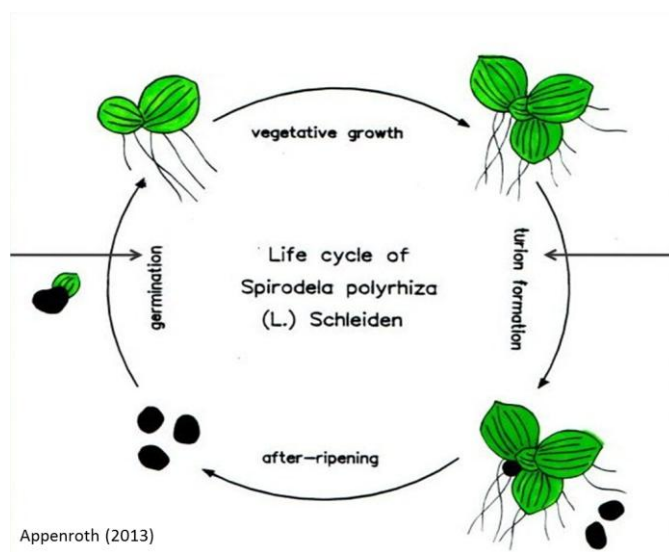
A faj életmenetének része, hogy dormans szártagokat képez a kedvezőtlen környezeti feltételek átvészelésére (pl. a hidegebb őszi, téli időszakokban). Ezek a dormans szártagok -telelőrügyek- 1-3 mm átmérőjű, lapos, gyökértelen, magas keményítő tartalmú képződmények (2. kép), melyek a vízfenékre süllyedve biztosítják a növény túlélését (Hilty 2013).



2. kép A bojtos békalencse (*S. polyrhiza*) és telelőrügyei (a Szerző felvétele)

A virágot illetve termést nagyon ritkán képező, elsősorban klonálisan szaporodó békalencse-fajok esetében a vegetatív propagulumok létrehozása fontos túlélési stratégia (Appenroth 2013). Ezt a stratégiát a *S. polyrhiza* mellett a *Lemna turionifera* esetében és a Wolffia-nemzetség fajainál is leírták már (Armstrong 2001). A békalencse fajokon kívül számos vízinövényre jellemző a vegetatív propagulumok képzése, így leírták többek közt a *Myriophyllum*, *Hydrilla* és *Potamogeton* genusok egyes fajainál is (Klimešová és Klimeš 2007, Jacobs 1947). A különböző növényfajok vegetatív propagulumai hasonló körülmények hatására képződnek, a szerepük is nagyon hasonló, segítik a növény terjedését, új élőhelyek kolonizálását és a kedvezőtlen időszakok átvészelését.

A *S. polyrhiza* számos kedvező tulajdonsága miatt (gyors szaporodás, laboratóriumban való könnyű tartása) gyakran alkalmazott tesztnövény. A faj teljes életciklusa, így a kitartó képletek létrehozásának mechanizmusa is jól ismert (2. ábra).



2. ábra A bojtos békalencse (*S. polyrhiza*) életmenete (Appenroth 2013)

2.1.1. A *S. polyrhiza* telelőrügyek felépítése

A telelőrügy szöveti felépítése alapján egy speciálisan módosult vegetatív szártag. Az aktív szártagokat és a telelőrügyeket is ugyanazon merisztémák hozzák létre. Ezért a telelőrügyek szöveti felépítésükben sok tekintetben megegyeznek a kifejlett növényekkel. A képződésük első szakaszában, a 0,2 mm hosszúság eléréséig a szártag-kezdemény még nem differenciálódik, a külső körülmények függvényében bármelyik irányba továbbfejlődhet (Jacobs 1947). Stressz hatására a primordiumok fejlődése átvált az alternatív útra, így az aktív szártagok helyett telelőrügyek képződnek.

A leglátványosabb különbség a telelőrügyek és a kifejlett növények közt elsősorban az előbbi kisebb mérete (1. kép), illetve a vese alakja, a szártagoknál megszokott ovális forma helyett, de emellett fontos különbség még a kevésbé differenciált mezofillum is (Jacobs 1947).

A telelőrügyek színe eltérő lehet, akár sötétzöld, olíva színű, vagy sárgás is (3. kép). A színük függ az anyanövény fiziológiai állapotától, a képződési körülményektől, és a tárolási feltételektől is (Jacobs 1947).



3. kép A *S. polyrhiza* telelőrügyei (Armstrong 2004)

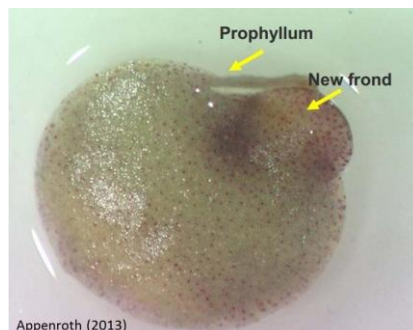
2.1.2. Telelőrügyek létrehozása

Természetes környezetben a *S. polyrhiza* a telelőrügyeket az életfeltételek romlásával (alacsony hőmérséklet, fény-, tápanyaghiány, stb), legtöbbször késő nyártól a vegetációs periódus végéig hozza létre. Laboratóriumi körülmények között a telelőrügy képződés indukcióját többek közt abszcizinsav, hőmérsékletcsökkenés (Smart 1996), valamint tápelem limitáció (Appenroth et al. 1989), de nehézfém (Cd) stressz (Srivastava és Jaiswal 1988) hatására is leírták.

A telelőrügyek optimális életfeltételek mellett is képződhetnek, mikor a fotoszintetikus asszimilátumok előállítása meghaladja a felhasználásuk (növekedés és respiráció) mértékét. A felesleget a növény tartalékként a telelőrügyekben halmozhatja fel. Ilyen esetekben a telelőrügy képződés kiváltásában szerepet játszik a magas fényintenzitás, a fotoperiódus hossza és a magas CO₂ koncentráció (Appenroth 2013).

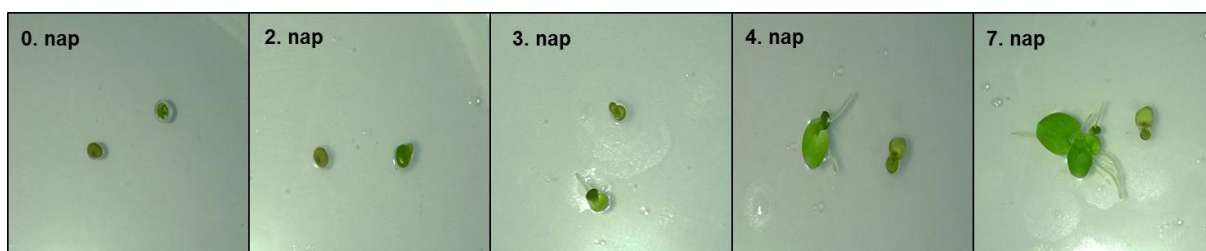
A kifejlődött telelőrügyek rövid ideig még vékony indácskákkal kapcsolódnak össze az anyanövénnyel, de könnyen szeparálódnak a fejlett abszcissziós rétegnek köszönhetően (Jacobs 1947, Newton et al. 1978). A leválás után a telelőrügyek az aerenchima hiánya, illetve a magas keményítő tartalom miatt a vízfénkre süllyednek (Appenroth et al. 1993).

Az újonnan létrehozott telelőrügyek nyugalmi (dormans) állapotban vannak, azaz még előnyös környezeti körülmények hatására sem hajtanak ki a lesüllyedésük utáni néhány hétben. Ez az állapot Appenroth et al. (1989) eredményei alapján egy „utóérési” folyamat során szűnik meg, fényhiány és alacsony hőmérséklet hatására.



4. kép Új szártagot létrehozó *S. polyrhiza* telelőrügy (Appenroth 2013)

Ezt követően, kedvező körülmények közé kerülve, a fitokrómok által mediált szénhidrátlebontás indukciója miatt, a keletkező CO₂-gázbuborék segítségével úsznak fel a felszínre, ahol már a felületi feszültség fogja őket megtartani (Jacobs 1947). Itt a telelőrügyek új szártagokat létrehozva kolonizálják a vízfelszínt. Az első vegetatív szártagok létrehozásához a megfelelő fotoszintetikus kapacitás kifejlődéséig a raktározott keményítő mobilizálása szolgáltat szénforrást (Newton et al. 1978). Az új szártagok létrehozása előtt a telelőrügy megduzzad (4. kép), majd egy-két napon belül 2-5 gyökeret, illetve általában két (de akár 3-4) új rametet képes létrehozni (5. kép). A telelőrügyek közvetlenül mindig csak vegetatív rametet tudnak létrehozni, újabb telelőrügyet sosem. Több vegetatív generációnak kell eltelnie, mire ismét telelőrügy képződhet (Jacobs 1947).



5. kép *S. polyrhiza* telelőrügyek kihajtásának első hete (a Szerző felvétele)

2.2. A nehézfémek előfordulása a felszíni vizekben, és hatásaik a növényi szervezetben

A növekvő ipari tevékenységekkel, mezőgazdasággal, és számos egyéb antropogén tevékenységgel, egyre több nehézfém kerül közvetlenül, vagy közvetve a vízi ökoszisztémákba (Hu et al. 2013). A felszíni vizek áramlása ugyan csökkenti a feldúsulásukat, az üledékben azonban gyakran sokkal nagyobb mennyiségben lehetnek jelen (Gruiz et al. 2001).

A nehézfémek reakcióba lépnek a szerves vegyületek (elsősorban a fehérjék) kénatomjaival, és denaturálják a fehérjék jelentős részét (Gyires et al. 2011). Különösen veszélyes vegyületek közé tartozik a higany, a kadmium, az ólom és a króm, de a nikkel is.

A nikkel a szennyezetlen felszíni vizekben jellemzően $1-3 \mu\text{g l}^{-1}$ koncentrációban fordul elő (Moore és Ramamoorthy 1982). Antropogén terhelés, vagy speciális feltételek (pl. magas nikkel-tartalmú kőzet mállása) hatására azonban az oldott nikkel koncentráció $100-200 \mu\text{g l}^{-1}$ -re is emelkedhet (Moore és Ramamoorthy 1982, Atri 1987). Az üledék-fázis nikkel-tartalma jelentősen meghaladhatja a felette elhelyezkedő víztestét. A terület nehézfém-terhelésétől függően néhány tíz mg kg^{-1} -től több száz (akár több ezer) mg kg^{-1} -ig is terjedhet (Moore és Ramamoorthy 1982). A nikkel a növények számára esszenciális nyomelem, az ureáz-enzim felépítésében vesz részt. Hiányában az urea-táplálás nekروزist okoz a növények levelein és gátolja a növekedést (Fodor és Zsoldos 2007). Magas koncentrációban azonban toxikus (DalCorso 2012), növekedésgátlást, klorozist, esetleg nekروزist okoz, illetve befolyásolhatja más kétszeresen pozitív töltésű ionok felvételét (Fodor és Zsoldos 2007). A békalencse-fajokkal végzett ökotoxikológiai tesztekben ú.n. "referencia"-méregként is használják a teszt-rendszerek érzékenységének összevetésére (Environment Canada 2007).

A kadmium erős sejtméreg, a növények számára nem esszenciális nehézfém. Már kis koncentrációban erős toxikus hatást vált ki, mind a szárazföldi, mind pedig a vízi szervezetekre. A kadmium fehérjedenaturáló és oxidatív hatása mellett fokozza a szenescenciát és a fotoszintézis folyamatait is több ponton gátolja számos növényfaj esetében (Jana és Chaudhury 1982). Elsősorban ipari folyamatok során kerül a légkörbe, majd a talajban, felszíni vizekben és a növényzetben halmozódhat fel, de bizonyos műtrágyákban is előfordulhat (Fodor és Zsoldos 2007). Vízterekben könnyen feldúsulhat az üledék felsőbb rétegeiben, ahol akár 10 mg kg^{-1} mennyiségben is előfordulhat, a felszíni vizekben pedig a körülményektől függően, $0,001-4 \mu\text{g l}^{-1}$ koncentráció-tartományban lehet jelen (WHO 2011).

2.3. A békalencse fajok alkalmazása nehézfémek hatásainak a kimutatására

A békalencse-fajoknak számos előnyös tulajdonsága van, melyek miatt régóta használt ökotoxikológiai teszt-objektumok (Environment Canada 1999). Laboratóriumban is könnyen nevelhetők, jellemzően vegetatív szaporodásuk miatt pedig genetikailag homogén tenyészetek nyerhetők. Szaporodásuk és növekedésük gyors, megfelelő körülmények között akár 2 nap alatt megduplázzák a biomassájukat. Széleskörű elterjedésük miatt alkalmasak egy adott terület magasabbrendű vízinövényeinek reprezentálására az ökotoxikológiai vizsgálatokban. A békalencse-fajok nehézfémekkel szembeni válaszainak kiterjedt szakirodalma van, az utóbbi évtizedekben kifejlesztett szabványoknak köszönhetően standard körülmények közt végezhetők velük a vizsgálatok (Environment Canada 1999). A DE TTK Növényteni Tanszékén több éve folynak vizsgálatok a békalencse-fajok, köztük a *S. polyrhiza*, nehézfémekkel szembeni válaszainak feltárására (Oláh et al. 2008, Oláh et al. 2010, Hepp et al. 2013a, Hepp et al. 2013b).

A *S. polyrhiza*-hoz hasonlóan más vízi növények életmenetében is fontos túlélési stratégia a vegetatív propagulumok létrehozása (Klimešová és Klimeš 2007). Ezeknek egy része a telelőrüghöz hasonlóan lesüllyed a vízfénkre, ahol hosszú ideig életképesek maradnak, így gyakran sokáig ki lehetnek téve az adott víztestbe kerülő szennyezések hatásainak. Bár a telelőrügek képződése és kihajtása is élettaniilag már jól leírt folyamat, a kitartó képletek szennyezőanyagokkal (pl. nehézfémekkel) szembeni toleranciájáról, az általuk kiváltott telelőrügy képződésről kevés irodalmi adat található.

Xyländer et al. (1993) *S. polyrhiza*val kapcsolatos eredményei alapján, a nikkel $100\mu\text{M}$ koncentrációban teljesen megakadályozta a telelőrügek képződését, míg a vegetatív rametek képződése csak 50%-kal csökkent ugyanennél a koncentrációnál. Megfigyelték továbbá, hogy nikkel tartalmú tápoldatban (akár $10\ \mu\text{M}$ Ni) képződött telelőrügek nem mutatták a telelőrügekre jellemző dormanciát, így kedvezőtlen körülmények közt is rövid időn belül kihajtottak. Hasonló eredményekre jutottak a kadmium hatásainak vizsgálata során is.

Srivastava és Jaiswal (1988) munkájuk során a kadmium hatását vizsgálták a *S. polyrhiza* L. telelőrügy képzésére és kihajtására. Eredményeik alapján a kadmium gátolta a *S. polyrhiza* növekedését, de serkentette a telelőrügek képződését, szemben Xyländer et al. (1993) eredményeivel. $10\ \text{mg l}^{-1}$ kadmium hatására már 10 nap után megindult a telelőrügek képződése, míg a kontroll körülmények között 20 nap után sem tapasztalták ezt. Emellett azt is kimutatták, hogy $12\text{-}20\ \text{mg l}^{-1}$ kadmiumot tartalmazó tápoldatban a telelőrügek kihajtása már gátolt volt, vagy egyáltalán nem következett be.

Susplugas et al. (2000) króm (VI)-tal végzett kísérleteket, és ő is azt tapasztalta, hogy a 10 napos nehézfém-kezelés hatására 20 μM -tól megindult a telelőrügyek képzése.

3. Célkitűzések

A legtöbb vízinövény-faj esetében a szexuális szaporodás kiegészül, vagy kiváltásra kerül vegetatív szaporodási módokkal is, amelyek vizes környezetben hatékonyabban biztosíthatják a populáció túlélését és terjedését. A vegetatív propagulumokon alapuló stressz-elkerülő stratégia kiváltó okairól, adott környezeti feltételek között a sikerességéről és a kitartó képletek szennyező anyagokra adott válaszáiról kevés ismerettel rendelkezünk.

A bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) az elterjedtsége, könnyű laboratóriumi kezelhetősége és életmenetének sajátossága miatt, a vegetatív propagulumok vizsgálatára is alkalmas szervezet. Munkánk során a bojtos békalencse aktív és dormans életszakaszának érzékenységét mértük fel akut kadmium- és nikkel-kezelésekkel szemben, annak vizsgálatához, hogy az időjárási szélsőségek elkerülésére kifejlődött stratégia sikeres-e más abiotikus stressz-tényezőkkel szemben is.

Célkitűzéseink a következőek voltak:

1. Milyen érzékenységet mutat a bojtos békalencse aktív szártagjainak a növekedése a két alkalmazott nehézfémrel szemben?
2. Kiváltanak-e az alkalmazott nehézfémek telelőrügy-képződést, mint egyfajta stressz-válaszreakciót?
3. Befolyásolják-e a nehézfém-kezelések a telelőrügyek túlélési és kihajtási sikerességét?
4. A kifejllett növényekhez viszonyítva, milyen érzékenységet mutatnak a telelőrügyek a nehézfém-kezelésekkel szemben?
5. Milyen különbségek tapasztalhatók a kadmium- és a nikkel-kezelések hatásában a bojtos békalencse különböző életszakaszaiban?

4. Anyag és módszer

4.1. A tesztnövények

Vizsgálatainkban, a hazai vizekben is elterjedt bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) axenikus tenyészetét használtuk (6. kép) (Oláh et al. 2010). A tenyészetek alapjául szolgáló növények begyűjtése 2004-ben történt a Kis-Balaton területén, a tenyészetek fenntartása azóta folyamatos, a DE TTK Növénytani Tanszék Növény és Szövettenyésztési laboratóriumában (folyamatos megvilágítás, fehér, PPFD $80 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérséklet), Steinberg tápoldaton (Environment Canada 2007).



6. kép A bojtos békalencse (*S. polyrhiza*) telelőrugyei (balra) és axenikus törzstenyészet (jobbra, a Szerző felvétele)

4.2. A kísérleti körülmények

4.2.1. A kifejlett növényekkel végzett kísérletek

Az aktív szártagok vizsgálatához 7-10 napig előnevelt tenyészeteket használtunk. A nehézfém-kezelések 80 mm átmérőjű kristályosító csészékben történtek, $100\text{-}100 \text{ cm}^3$ CdSO_4 vagy NiSO_4 -tartalmú Steinberg-tápoldaton, 8-12 db szártag (ramet) kiindulási biomasszával.

A kadmium-kezeléseket 0; 0,001; 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,175; 0,25; 0,375; 0,5; 0,75 és 1 mg l^{-1} Cd végkoncentrációkkal végeztük. A nikkel-kezelésekben 0; 0,01; 0,05; 0,100; 0,175; 0,25; 0,375; 0,5; 0,75; 1; 5 és 10 mg l^{-1} Ni végkoncentrációkat használtunk.

A tesztek egyéb feltételei megegyeztek a törzstenyészetek nevelési körülményeivel.

A tenyészetek növekedését, illetve a nehézfémek által indukált növekedésgátlást (I%) a tenyészetekről a kezelések 0. és 7. napján készített digitális felvételek feldolgozásával mértük (ImageJ v1.45 képelemző szoftver, Abramoff et al. 2004). A növekedés sebességét, valamint a gátlás mértékét a képződő új rametek száma, illetve az asszimiláló felület változása alapján számolt relatív növekedési rátákkal jellemeztük (Environment Canada 2007):

$$\text{RGR} (X X^{-1} \text{ nap}^{-1}) = (\ln X_7 - \ln X_0) / t$$

Ahol: X_0 illetve X_7 = a 0. és 7. napon mért biomassza (cm^2 levélfelület, illetve db ramet), t = a két mérés között eltelt idő, napokban kifejezve.

A különböző nehézfém koncentrációknál kapott növekedési rátákat a kontroll tenyészetek átlagához viszonyítva kiszámoltuk a nehézfém-indukált növekedésgátlás (I%) mértékét is a tenyészetekben, az alábbi képlet segítségével (OECD 1998):

$$I\% = ((\text{RGR}_{\text{kontroll}} - \text{RGR}_{\text{kezelt}}) / \text{RGR}_{\text{kontroll}}) * 100$$

A tenyészetekben a nehézfém-kezelés hatására esetleg meginduló telelőrügy képződést is nyomon követtük. A digitális fotókon azonosítható telelőrügyek száma alapján számoltuk a telelőrügyek képződési arányát (T%), amely a telelőrügyek relatív számát fejezi ki az összes új utód rametek számához viszonyítva egy adott időszak alatt, az alábbi képlet szerint:

$$T\% = N_{\text{telelőrügy}} / (N_{\text{telelőrügy}} + N_{\text{új aktív szártag}}) * 100$$

4.2.2. A telelőrügyekkel végzett kísérletek

A telelőrügyek képződését tápelem-hiánnyal indukáltuk. A kiöregedő és túlnövő tenyészetekben 4-6 hét alatt spontán beindult a telelőrügyek képződése, amelyek a nevelőedények aljára kiüledtek, ahonnan összegyűjtöttük, és sötétben, 6 °C-on tároltuk (6. kép).

A telelőrügyekkel végzett vizsgálatokhoz megtört dormanciájú telelőrügyeket használtunk, amelyeket 4-6 hétig ioncserélt vízben, 6 °C-on, sötétben tároltuk a felhasználásuk előtt (Hepp et al. 2013a).

Ezt követően párhuzamosonként 30-40 telelőrügyet 6 °C-on, gyenge megvilágítás mellett helyeztünk át 20 cm^3 kezelőoldatot (Steinberg-tápoldat + kadmium/nikkel-szulfát) tartalmazó kémcsövekbe. A nehézfém-kezeléseket 7 napig végeztük, ez időszak alatt a telelőrügyeket a kezelőoldatokban a tárolási körülményeknek megfelelő módon tartottuk. A kezelésekhez mind a nikkel, mind pedig a kadmium esetében 0; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 mg l^{-1} koncentrációkat tartalmazó Steinberg-tápoldatot használtunk (Hepp et al. 2013a).

A kezelések lejárta után a telelőrügyeket desztillált vízzel lemostuk, majd $100\text{-}100 \text{ cm}^3$ tiszta, Steinberg-tápoldatot tartalmazó 80 mm átmérőjű kristályosító csészékbe helyeztük. A kihajtatásuk a törzstenyészetek fenntartási körülményeinek megfelelő módon történt.

A nehézfémek telelőrügyekre gyakorolt hatását az alábbi paraméterekkel jellemeztük:

1. A vízfelszínre felúszott telelőrügyek aránya 24, 48 és 96 óra elteltével (%).

2. A kihajtatás 7. napjára, egy telelőrügy által létrehozott új rametek száma, és összes felülete, illetve a 4. és 7. napon mért rametszámok és asszimiláló felületek alapján számolt relatív növekedési ráták. Ezen paraméterek meghatározása a növekedési tesztekben már ismertetett módon, digitális fotók alapján történt.

4.3. A vizsgálatok eredményének feldolgozása, értékelése

A kifejlett növényekkel, illetve telelőrügyekkel végzett tesztek koncentrációnként 4 párhuzamossal végeztük. A kísérleteket ugyanazon összeállításban kétszer megismételve végeztük el. A hatások jellemzéséhez így minden esetben 8 párhuzamos minta eredményeit összesítettük.

A kapott eredmények feldolgozása, az átlagok és szórások számolása MS Office Excel 2007 szoftverrel, a varianciák és átlagértékek összehasonlítása egyutas ANOVA módszerrel, illetve *post-hoc* Tukey-tesztel (Past v2.0, Hammer 2001) történt. Az átlagok közti különbségeket $p < 0,05$ szintnél tekintettük szignifikánsnak. Az aktív szártagok esetében a nehézfémek hatását a legalacsonyabb, már szignifikáns gátláshoz szükséges nehézfém-koncentrációval (LOEC), és az 50%-os növekedésgátláshoz szükséges nehézfém-koncentrációval (EC₅₀) jellemeztük. Az EC₅₀ kiszámításához a koncentráció-gátlás összefüggést mindkét nehézfém és növekedési paraméter esetében négyparaméteres, logisztikus regressziós modellel írtuk le (Systat SigmaPlot 11.0).

5. Eredmények

5.1. Nikkel-kezelések

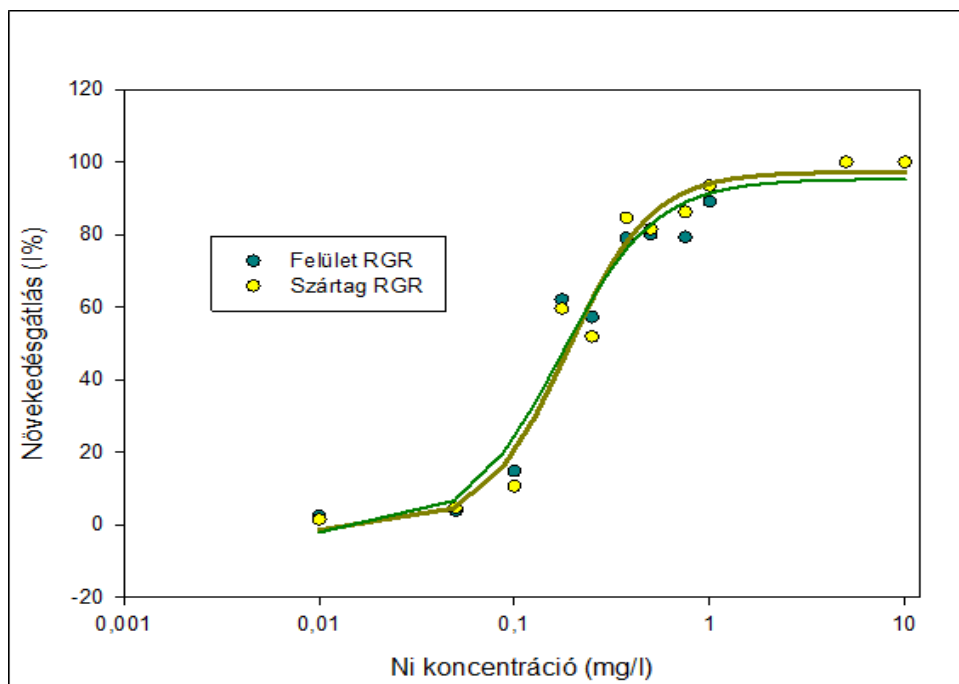
5.1.1. Nikkel-kezelések hatása a *S. polyrhiza* tenyészetek növekedésére

A növekedés gátlását a kontroll értékekhez (felületre nézve $RGR = 0,348 \pm 0,025 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$, szártag $RGR = 0,343 \pm 0,027 \text{ ramet ramet}^{-1} \text{ nap}^{-1}$) viszonyítva számoltuk, a tenyészetek felületében és a szártagok számában bekövetkezett változások alapján (3. ábra).

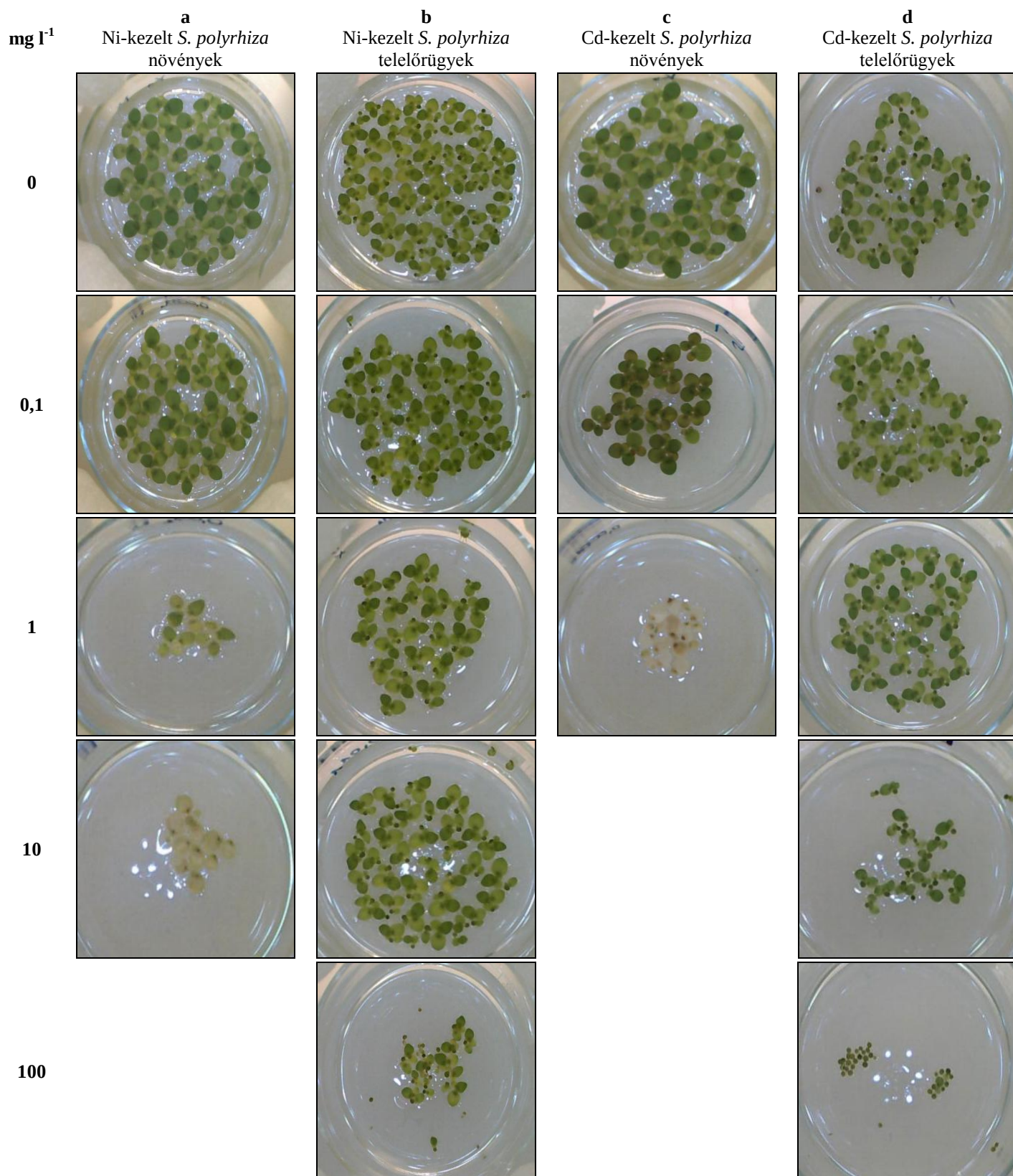
Az általunk alkalmazott alacsonyabb nikkel koncentrációk ($0,01\text{-}0,1 \text{ mg l}^{-1}$) esetében a normál szártagok levélfelületre vonatkoztatott növekedési sebessége ($0,297\text{-}0,340 \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ nap}^{-1}$) nem tért el szignifikánsan a kontroll értékektől. A legalacsonyabb alkalmazott koncentráció, ahol már szignifikáns gátlás tapasztaltunk (LOEC) $0,175 \text{ mg Ni l}^{-1}$ volt, ekkor a növekedés a tenyészetek felülete alapján számolt növekedési rátában 62 %-os gátlást mutatott a kontroll értékekhez képest ($p < 0,001$). A további, magasabb nikkel koncentrációk hatására a növekedés gátlása tovább erősödött, $0,375\text{-}0,75 \text{ mg l}^{-1}$ nikkel esetén már 80% volt. 1 mg Ni l^{-1} koncentrációknál a számolt növekedési ráták alapján már szinte teljesen leállt a tenyészetek növekedése, itt 90 %-os gátlást tapasztaltunk. Az ennél magasabb koncentrációkban ($5 \text{ és } 10 \text{ mg l}^{-1}$) a növények klorózisa és nekrózisa miatt az abszolút biomassa csökkent, azaz negatív növekedési rátákat számoltunk. Ezekben az esetekben a növekedést 0-nak, így a növekedésgátlást 100%-nak tekintettük (3. ábra) (7. kép, a oszlop).

A rametek alapján számolt relatív növekedési ráták gátlása a levélfelület változásához hasonló mintázatot mutatott (3. ábra). A legalacsonyabb, szignifikánsan gátló koncentráció $0,175 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ni}$ volt, amely 60%-os gátlást ($0,138 \pm 0,046 \text{ ramet ramet}^{-1} \text{ nap}^{-1}$, $p < 0,001$) okozott. A magasabb nikkel koncentrációk ($0,375\text{-}0,75 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ni}$) hatására a növekedés gátlása tovább erősödött, 81-86% volt ($0,063\text{-}0,047 \text{ ramet ramet}^{-1} \text{ nap}^{-1}$, $p < 0,001$). 5 mg Ni l^{-1} koncentrációtól a számolt növekedési ráták alapján már teljesen leállt a tenyészetek növekedése, a kolóniák feldarabolódása volt megfigyelhető, illetve a tenyészetek pusztulása miatt negatív növekedési értékeket kaptunk ($-0,024 \pm 0,058 \text{ ramet ramet}^{-1} \text{ nap}^{-1}$, 3. ábra) (7. kép, a oszlop).

A szártagok számának és a levélfelületek változása alapján számolt EC50 érték mindkét esetben $0,191 \text{ mg l}^{-1}$ nikkel volt (3. ábra).



3. ábra A *S. polyrhiza* relatív növekedési rátái (RGR) alapján számolt növekedésgátlás a kontroll tenyészetekhez viszonyítva, hétnapos nikkelkezelés hatására. Az egyes nikkel koncentrációkhoz tartozó gátlásokat 8 párhuzamos minta átlaga alapján számoltuk. A koncentráció-válasz összefüggést leíró regressziós görbék négyparaméteres, logisztikus modellel készültek.



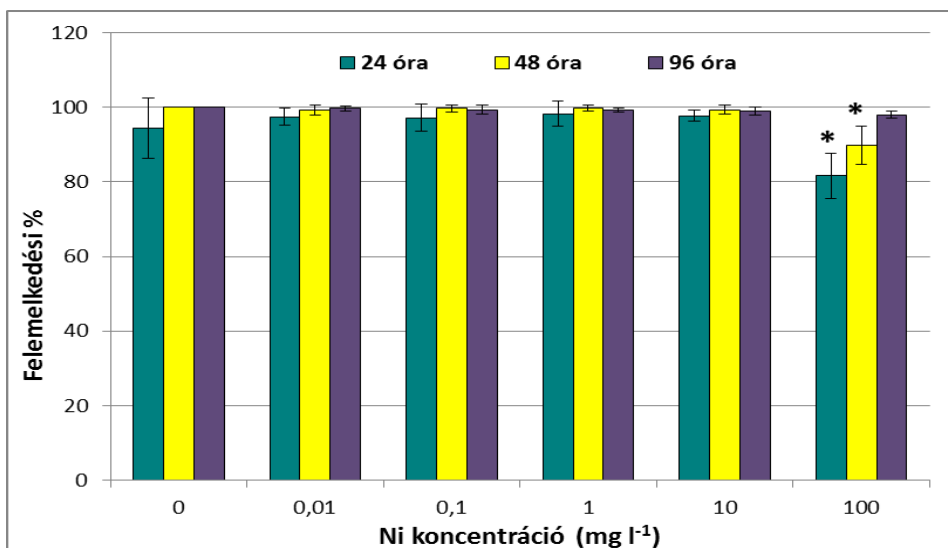
7. kép A kifejlett *S. polyrhiza* növények (a és c oszlop), illetve telelőrügyek (b és d oszlop) axenikus tenyésztési a hétnapos nikkel- (a és b oszlop) illetve kadmium- kezeléseket (c és d oszlop) követően. Az alkalmazott nehézfém koncentrációk a bal oldali oszlopban vannak feltüntetve. (a Szerző felvétele)

5.1.2. Nikkel-kezelések hatása a telelőrügek felúszására és kihajtására

A *S. polyrhiza* telelőrügek nikkel-kezelés utáni kihajtása során a 24 és 48 óra elteltével vízfelszínre emelkedett telelőrügek arányában nem tapasztaltunk különbséget a kontroll kezelés, illetve a 0,01-10,0 mg l⁻¹ Ni koncentrációk hatása közt (4. ábra).

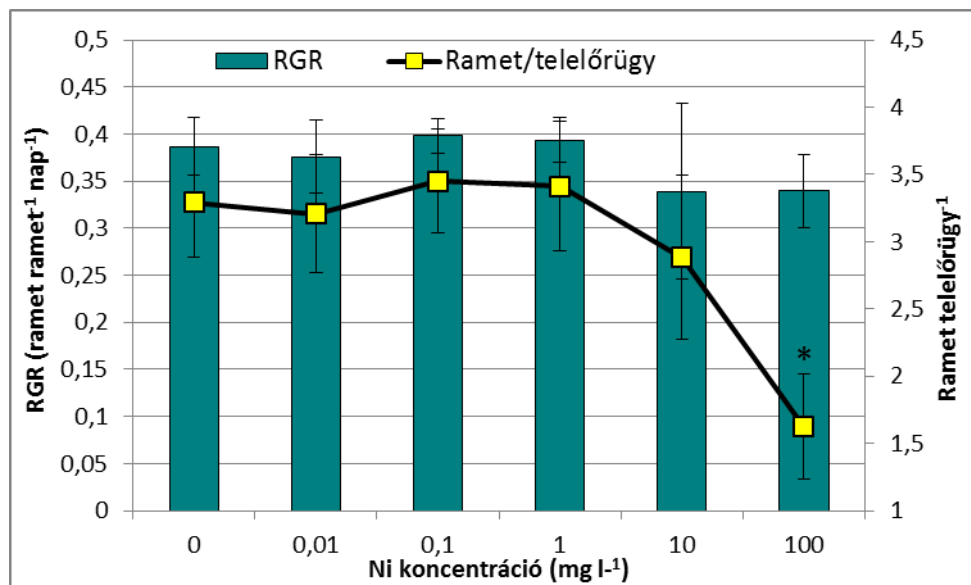
24 óra kihajtás után a kontroll telelőrügek 94,4±8,0%-a, 48 óra után 100±0,0%-a úszott fel, amitől az alacsonyabb nikkel-koncentrációkkal kezelt minták sem maradtak el, sőt 24 óra elteltével némileg meg is haladták azt (97-98%-os felúszás 24 óra múlva, 98-99%-os 48 óra múlva). Egyedül a legmagasabb, 100 mg l⁻¹ koncentrációban tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Ennél a koncentrációnál 24 óra után a telelőrügek 81,7±6,0%-a (p<0,05), 48 óra után 89,8±5,0%-a (p<0,001) emelkedett csupán a felszínre (4. ábra).

96 óra elteltével valamennyi nikkel koncentrációban a telelőrügeknek közel a 100 %-a a felszínre emelkedett, aktiválódott (4. ábra).



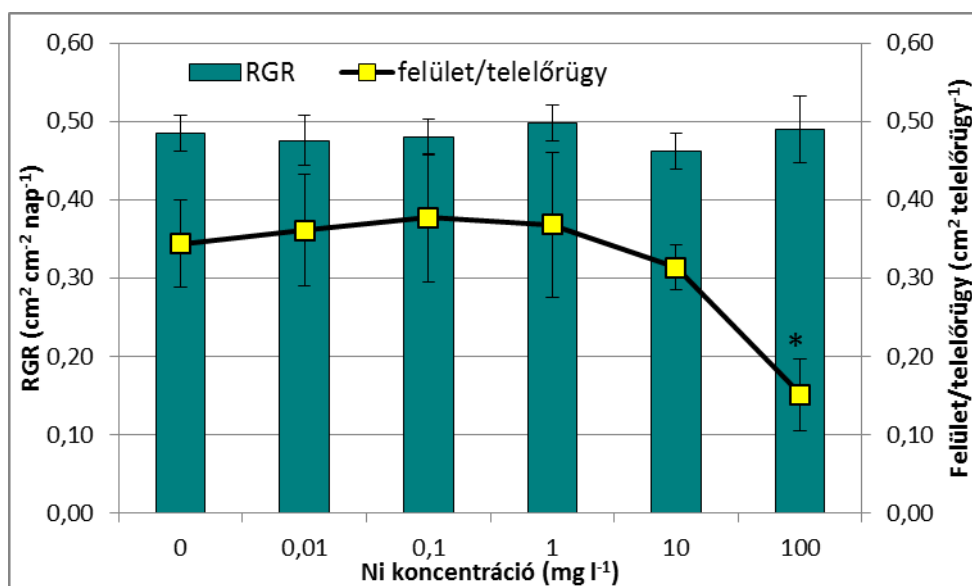
4. ábra A *S. polyrhiza* telelőrügek Ni-kezelés utáni felúszási aránya (%) 24, 48 és 96 óra elteltével. Átlag±SD (n=8), a *-gal jelzett kezelések átlaga szignifikánsan különbözik a megfelelő kontrolltól (p<0,05).

Az egy telelőrügy által a kihajtás 7. napjára létrehozott új rametek száma csak a 100 mg l⁻¹ nikkel koncentrációban mutatott szignifikáns gátlást (1,62±0,39 ramet telelőrügy⁻¹, p<0,001). A többi koncentrációban a kontroll értékhez (3,29±0,41 ramet telelőrügy⁻¹) hasonló volt ez az arány (2,88-3,45 ramet telelőrügy⁻¹, p>0,05). Ha azonban a 4. és 7. nap között létrehozott új rametek alapján számolt növekedési rátákat hasonlítjuk össze, egyetlen alkalmazott nikkel koncentráció esetében sem volt szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva (a kontroll RGR értéke 0,387±0,03 ramet ramet⁻¹ nap⁻¹, míg a kezelt tenyészeteknél 0,339-0,398 ramet ramet⁻¹ nap⁻¹, 5. ábra)(7. kép, b oszlop).



5. ábra Az egy teelőrűgy által a kihajtatás 7. napjára létrehozott új rametek száma (ramet teelőrűgy⁻¹ átlag±SD, n=8), és a 4. és 7. nap között megjelenő rametek alapján számolt relatív növekedési ráták (RGR). A *-gal jelzett kezelések átlaga szignifikánsan különbözik a kontrolltól (p<0,05).

Az egy teelőrűgy által, a kihajtatás 7. napjára létrehozott asszimiláló felület a legmagasabb (100 mg l⁻¹) nikkelt koncentráció hatására 56%-kal (0,15±0,05 cm² teelőrűgy⁻¹, p<0,0001) maradt el a kontroll értékétől (0,34±0,06 cm² teelőrűgy⁻¹)(7. kép, b oszlop). Alacsonyabb nikkelt koncentrációk alkalmazásakor azonban a kontrollhoz hasonló felület/teelőrűgy arányokat tapasztaltunk (0,31-0,37 cm² teelőrűgy⁻¹), szignifikáns eltérés egyik esetben sem volt. A kisebb felületek ellenére a kihajtatás 4. és 7. napja alapján számolt növekedési ráták minden koncentráció esetében közel egyformák voltak (0,462-0,497 cm² cm² nap⁻¹, p>0,05)(6. ábra).

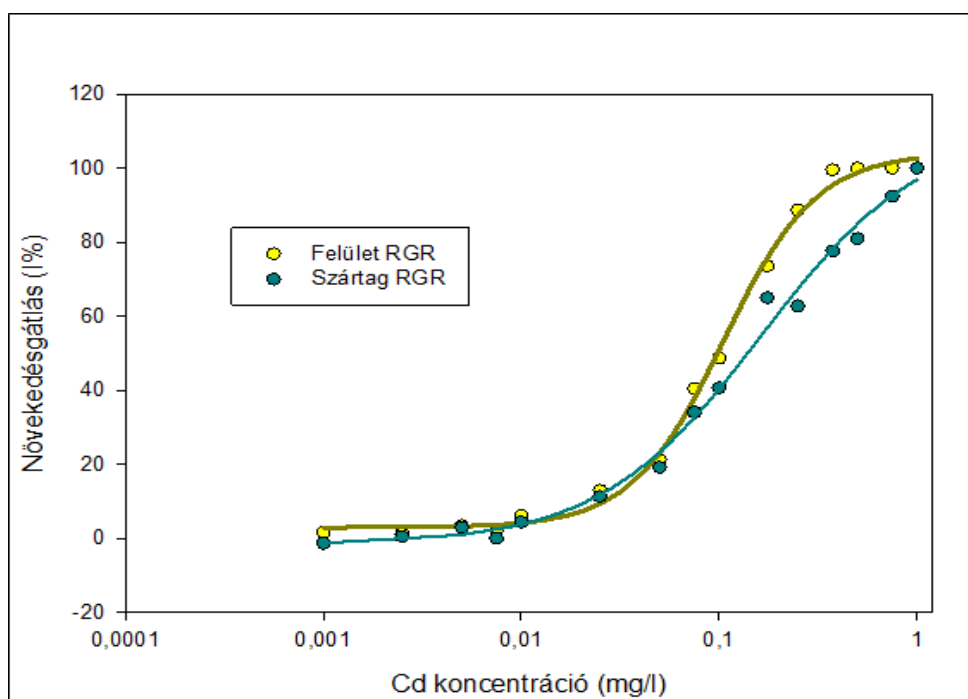


6. ábra Az egy teelőrűgy által, a kihajtatás 7. napjára létrehozott átlagos (±SD, n=8) asszimiláló felület, és a 4. és 7. napon mért felületek alapján számolt átlagos (±SD, n=8) relatív növekedési ráták (RGR). A *-gal jelzett kezelések átlaga szignifikánsan különbözik a kontrolltól (p<0,05).

5.2. Kadmium-kezelések

5.2.1. Kadmium-kezelések hatása a *S. polyrhiza* tenyészetek növekedésére

Az aktív szártagok levélfelületre vonatkoztatott növekedési sebessége az általunk alkalmazott alacsonyabb kadmium koncentrációk ($0,001\text{--}0,01\text{ mg l}^{-1}$) mellett nem tért el szignifikánsan a kontroll értékektől (kontroll: $0,366 \pm 0,018\text{ cm}^2\text{ cm}^{-2}\text{ nap}^{-1}$, $0,001\text{--}0,1\text{ mg l}^{-1}$ esetében: $0,362\text{--}0,344\text{ cm}^2\text{ cm}^{-2}\text{ nap}^{-1}$). A felületek alapján a legalacsonyabb effektív koncentráció (LOEC) $0,05\text{ mg l}^{-1}\text{ Cd}$ volt, ennél a koncentrációnál már 21 % volt a növekedésgátlás értéke ($p=0,032$) a kontrollhoz viszonyítva (7. ábra). $0,05\text{ mg l}^{-1}$ -től kezdve, a magasabb kadmium koncentrációkban meredekebben megnőtt a növekedésgátlás mértéke. $0,075\text{ mg l}^{-1}$ kadmium hatására már 40 %-os gátlás, $0,1\text{ mg Cd l}^{-1}$ koncentrációnál 49 %, míg $0,175\text{ mg l}^{-1}$ kadmiumnál már 74 % volt a növekedésgátlás (7. ábra). A tenyészetek felületváltozása alapján a maximális gátlás $0,375\text{ mg l}^{-1}$ -es koncentrációtól következett be, innentől kezdve a növekedés teljesen leállt, és a tenyészetek pusztulása volt megfigyelhető (7. kép, c oszlop).



7. ábra A *S. polyrhiza* relatív növekedési rátái (RGR) alapján számolt növekedésgátlás a kontroll tenyészetekhez viszonyítva, a hétnapos kadmium kezelés hatására. Az egyes nikkelkoncentrációkhoz tartozó gátlások 8 párhuzamos minta átlagát mutatják. A koncentráció-válasz összefüggést leíró regressziós görbék négyparaméteres, logisztikus modellel készültek

A rametekre vonatkoztatott relatív növekedési ráták esetében a legalacsonyabb, szignifikánsan gátló Cd koncentráció $0,075\text{ mg l}^{-1}$ volt ($0,240 \pm 0,085\text{ ramet ramet}^{-1}\text{ nap}^{-1}$, $p < 0,001$) (7. ábra). $0,375\text{--}0,75\text{ mg l}^{-1}\text{ Cd}$ esetében a növekedésgátlás már jelentős (78-100 %, 20

$p < 0,05$) volt a kontroll ($0,364 \pm 0,017$ ramet ramet⁻¹ nap⁻¹) értékekhez viszonyítva. A két növekedési paramétert összevetve az is megállapítható, hogy az új rametek létrehozását kevésbé gátolta a Cd, mint a levélfelület növekedését (7. ábra).

Az általunk számolt EC50 a felületváltozások alapján $0,106 \text{ mg l}^{-1}$, míg a ramet változások alapján $0,132 \text{ mg l}^{-1}$ kadmium volt (7. ábra).

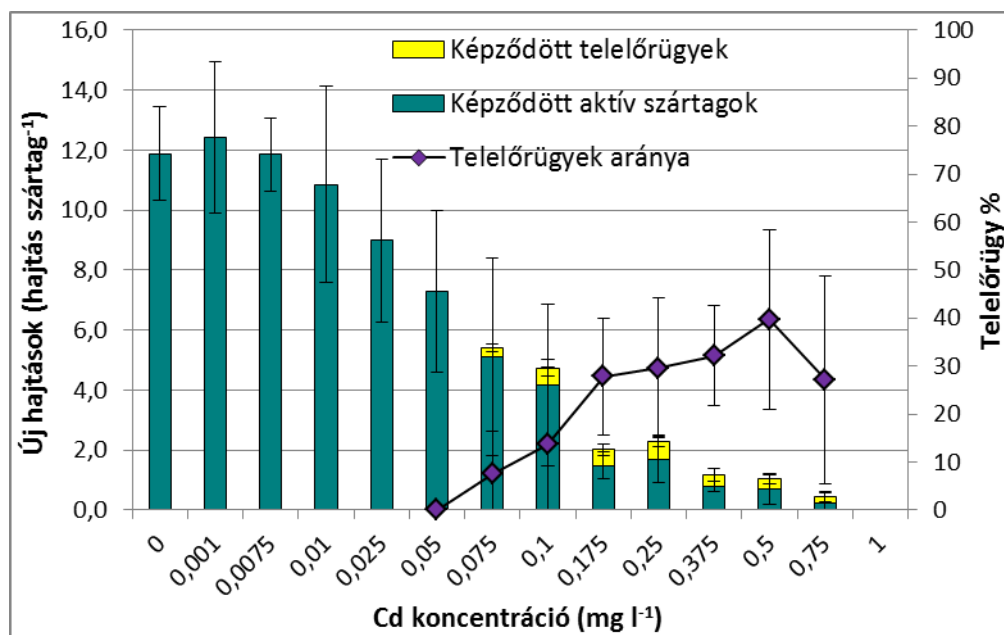
5.2.2. Kadmium-kezelések hatására telelőrügyek képződés indult

A kifejlett növényekkel végzett kísérletek során $0,075$ - $0,75 \text{ mg l}^{-1}$ koncentráció tartományban telelőrügyek is képződtek a kadmium kezelések hatására (8. kép). A növekvő kadmium koncentrációkban emelkedett a T% értéke, azt jelezve, hogy a tenyészetekben az újonnan képződött szártagok egyre nagyobb hányada volt telelőrügy (8. ábra).

$0,075 \text{ mg l}^{-1}$ Cd koncentráció mellett a képződött új sarjak 7,5%-a volt telelőrügy, a többi vegetatív szártag. $0,175 \text{ mg l}^{-1}$ Cd koncentrációtól kezdve megugrott a képződött telelőrügyek aránya, ennél a koncentrációnál az utódok 28%-a vált telelőrüggyé, míg $0,5 \text{ mg Cd l}^{-1}$ hatására több, mint 40%. A legmagasabb, még nem letális koncentrációban, $0,75 \text{ mg l}^{-1}$, a kadmium jelentősen lelassította az új szártagok és a telelőrügyek képzését is, ezért ott ismét csökkenő trendet tapasztaltunk a T% értékében (8. ábra).



8. kép Képződött telelőrügyek a kadmium kezelések hatására (Szerző felvétele)



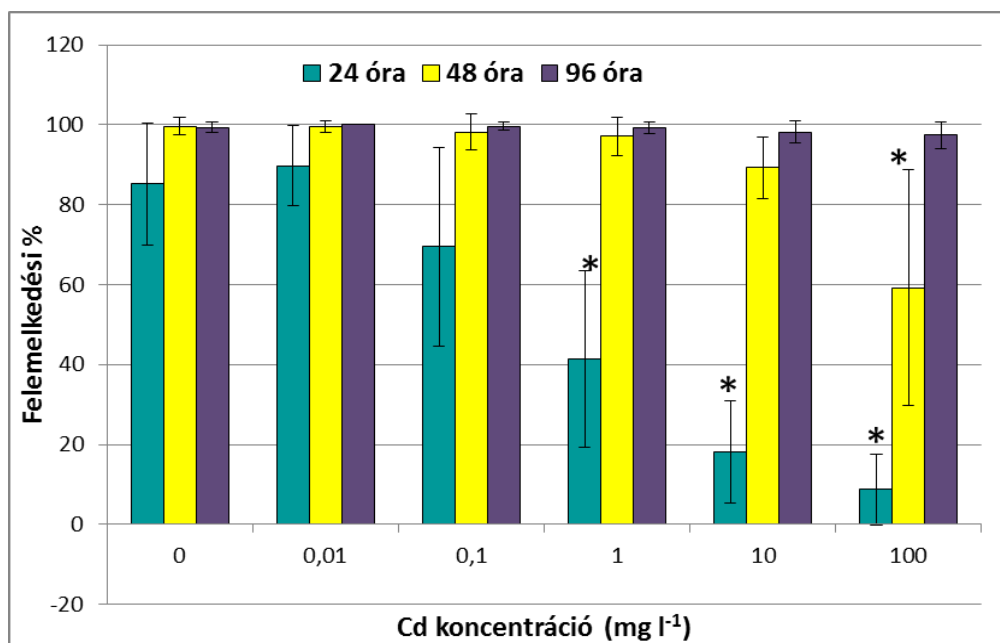
8. ábra Az újonnan létrehozott hajtások differenciálódása a kadmium kezelések 0. és 7. napja között egy szártagra nézve ($\pm$ SD, $n=8-12$).

5.2.3. Kadmium-kezelések hatása a telelőrügyek felúszására és kihajtására

A *S. polyrhiza* telelőrügyek Cd-kezelés utáni kihajtása során a 24, 48 és 96 óra elteltével vízfelszínre emelkedett telelőrügyek arányában nem tapasztaltunk különbséget a kontroll kezelés, illetve a $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ Cd koncentráció hatása közt (9. ábra). 24 óra kihajtás után a kontroll telelőrügyek $85,2 \pm 15,2\%$ -a, 48 óra után pedig már majdnem az összes ($99,6 \pm 2,0\%$) felúszott. $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ kadmium hatására 48 óra után szintén közel hiánytalanul felúsztak a telelőrügyek ($99,6 \pm 1,5\%$, NS). $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ kadmium koncentrációnál azonban csak $69,5 \pm 24,7\%$; 1 mg l^{-1} -nél $41,3 \pm 22,1\%$; 10 mg l^{-1} -nél $18,2 \pm 12,8\%$, míg 100 mg l^{-1} -nél mindössze $8,2 \pm 8,9\%$ úszott fel 24 óra alatt (9. ábra).

48 óra elteltével a felszínre emelkedett telelőrügyek alapján, a $0,1$ - 10 mg l^{-1} kadmiummal kezelt tenyészeteknél már nem volt szignifikáns az eltérés a kontroll tenyészetektől, viszont a legmagasabb, 100 mg l^{-1} , kadmium koncentrációnál 48 óra elteltével is csak a telelőrügyek $59,2 \pm 29,4\%$ -a ($p < 0,001$) emelkedett a felszínre (9. ábra).

96 óra elteltével valamennyi kadmium koncentrációban (0 - 100 mg l^{-1}) a telelőrügyeknek közel a 100% -a felszínre emelkedett, aktiválódott (9. ábra).

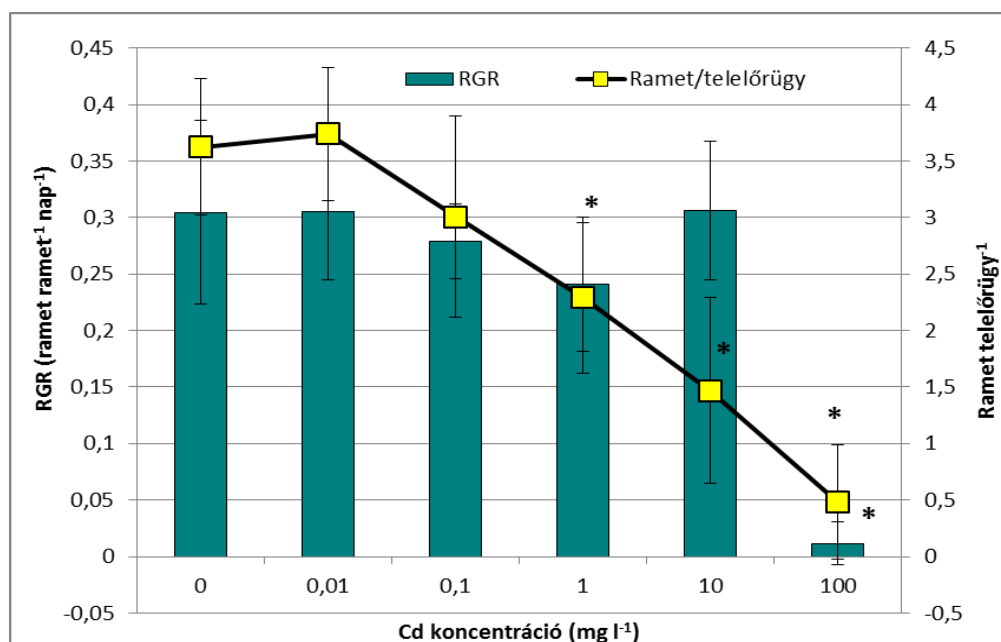


9. ábra *S. polyrhiza* telelőrügyek Cd-kezelés utáni felúszási aránya (%) a kihajtásuk 24., 48. és 96. órájában. Átlag $\pm$ SD (n=8), a *-gal jelzett kezelések átlaga szignifikánsan különbözik a megfelelő kontrolltól ($p < 0,05$).

A kontroll tenyészetekben egy telelőrügy a kihajtás 7. napjára átlagosan $3,63 \pm 0,6$ rametet hozott létre (10. ábra). Az alacsonyabb kadmium koncentrációk hatására ($0,01$ és $0,1 \text{ mg l}^{-1}$) ebben a mutatóban nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kontroll értékekhez

képest ($3-3,74$ ramet telelőrügy⁻¹, $p>0,05$). Az 1 mg l^{-1} Cd koncentrációtól kezdődően azonban az alkalmazott koncentrációval arányosan, szignifikánsan egyre kevesebb volt az egy telelőrügy által létrehozott rametek száma ($p<0,001$). 1 mg l^{-1} kadmiumnál ez az arány $2,29\pm0,67$, 10 mg l^{-1} esetén $1,47\pm0,82$, 100 mg l^{-1} -nél pedig átlagosan $0,48\pm0,51$ ramet telelőrügy⁻¹ volt (10. ábra).

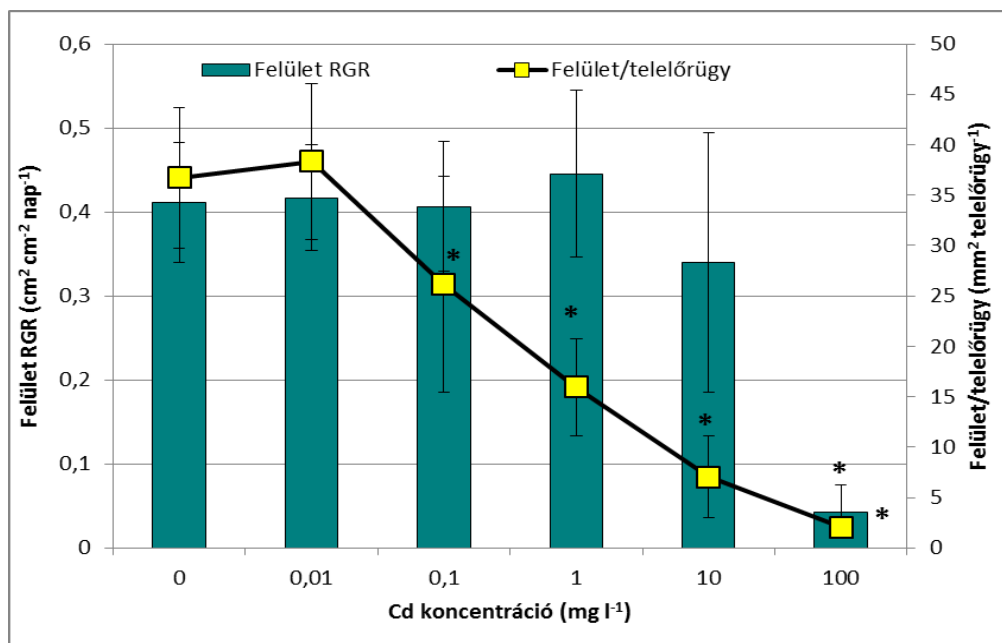
A kihajtatások 4. és 7. napja között létrehozott új rametek alapján számolt növekedési ráták csak a legmagasabb kadmium koncentráció esetében ($0,012\pm0,02$ ramet ramet⁻¹ nap⁻¹) mutattak szignifikáns gátlást a kontrollhoz ($0,305\pm0,08$ ramet ramet⁻¹ nap⁻¹) viszonyítva (10. ábra). A többi koncentrációban ($0,01-10 \text{ mg l}^{-1}$ Cd) a növekedési ráták a kontroll tenyészet értékeivel megegyező tartományban voltak ($0,306-0,205$ ramet ramet⁻¹ nap⁻¹) (10. ábra).



10. ábra Az egy telelőrügy által a kihajtatás 7. napjára létrehozott új rametek száma (ramet telelőrügy⁻¹ átlag $\pm$ SD, $n=8$), és a 4. és 7. napra megjelenő rametek alapján számolt relatív növekedési ráták (RGR). A *-gal jelzett kezelések átlaga szignifikánsan különbözik a kontrolltól ($p<0,05$).

Az egy telelőrügy által, a kihajtatás 7. napjára létrehozott asszimiláló felület érzékenysége a rametek átlagos számától annyiban tért el, hogy itt már $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ kadmium hatására szignifikánsan alacsonyabb értéket ($26,14\pm10,7 \text{ mm}^2$ telelőrügy⁻¹, $p=0,003$) mértünk a kontrollhoz ($36,71\pm6,93 \text{ mm}^2$ telelőrügy⁻¹) képest (11. ábra). A többi, magasabb kadmium koncentráció hatására 1 mg l^{-1} -nél 43,5%-át, 10 mg l^{-1} -nél 19,2%-át, míg 100 mg l^{-1} kadmium esetén csupán 5,6%-át tapasztaltuk a kontroll értékeknél mért felület/telelőrügy arányoknak (7. kép d oszlop).

A kisebb felületek ellenére a kihajtatás 4. és 7. napja alapján számolt növekedési ráták 0-10 mg l⁻¹ koncentrációkig közel egyformák voltak (0,445-0,340 cm² cm² nap⁻¹, p>0,05). A legmagasabb, 100 mg l⁻¹ kadmium koncentrációnál azonban szignifikánsan alacsonyabb (0,043±0,031 cm² cm² nap⁻¹, p<0,001) növekedési rátát tapasztaltunk (11. ábra).



11. ábra Az egy telelőrügy által, a kihajtatás 7. napjára létrehozott átlagos (±SD, n=8) asszimiláló felület, és a 4. és 7. napon mért felületek alapján számolt átlagos (±SD, n=8) relatív növekedési ráták (RGR). A *-gal jelzett kezelések átlaga szignifikánsan különbözik a kontrolltól (p<0,05).

6. Eredmények értékelése

6.1. A *S. polyrhiza* aktív életszakaszának vizsgálata

A *S. polyrhiza* aktív szártagok esetében azt tapasztaltuk, hogy míg a nikkel-kezelések esetén mind az asszimiláló felületben, mind pedig a ramet-számban $0,175 \text{ mg l}^{-1}$ koncentrációnál jelentkezett a növekedést gátló hatás, addig a kadmium már $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ koncentrációtól gátolta a tenyészetek fejlődését. A koncentráció-gátlás összefüggések alapján számolt EC_{50} értékek is a kadmium erősebb toxicitását mutatták az alkalmazott kísérleti körülmények között.

Az egyhetes nikkel-expozíció során az 50%-os növekedésgátlás kiváltásához az eltérő békalencse-fajok ellenére Naumann et al. (2007) eredményeivel jól egyező koncentráció-tartományokat kaptunk. Az általuk axenikus *Lemna minor* tenyészetekkel végzett vizsgálatok során az 50%-os növekedésgátlásához szükséges koncentrációt $0,218 \text{ mg Ni l}^{-1}$ -ben határozták meg. Ugyanezen kísérletsorozatukban a kadmium esetében a *L. minor* 50%-os gátláshoz $0,110 \text{ mg l}^{-1}$ (EC_{50}) effektív koncentrációt számoltak. Gaur et al. (1994) munkája során $0,09 \text{ mg l}^{-1}$ -ben határozta meg az 50%-os gátló Cd koncentráció értékét, 4 napos kezelése során. Ezen eredmények szintén jól egyeznek a *S. polyrhiza* esetében általunk tapasztalt gátló koncentrációkkal, az eltérő fajok ellenére.

6.2. A telelőrügy-képződés indukciója

A vízinövények jelentős részénél fontos túlélési stratégia, hogy a kedvezőtlen időszakokban vegetatív propagulumokat, kitartó képleteket hoznak létre. Egyes stresszfactorok hatására szintén kitartó képletek képződhetnek, amelyek jobban ellenállnak ezeknek a hatásoknak. Ilyen a *S. polyrhiza* által létrehozott telelőrügy is. Bizonyos stresszfactorok hatására, mint például a hideg, a tápelemhiány, vagy a nehézfémek jelenléte, a *S. polyrhiza* merisztémái áttérnek a normál fejlődési útvonalról a stresszhatásnak ellenállóbb telelőrügyek létrehozására.

Nikkel kezelések hatására a *S. polyrhiza*-ban megindul a keményítő intenzív felhalmozása (Appenroth et al. 2009), azonban míg a kadmiummal kezelt növényekben már az egyhetes növekedési teszt során megjelentek a telelőrügyek, addig a nikkel kezeltekben nem tapasztaltunk ilyet. A kadmium kezelések során a $0,075\text{-}0,75 \text{ mg l}^{-1}$ koncentráció tartományban jelentek meg telelőrügyek. Megjelenésükkel párhuzamosan a vegetatív szártagok képzése csökkent a tenyészetekben, és az emelkedő kadmium koncentrációk

hatására a képződő új hajtásoknak egyre nagyobb része volt telelőrügy ($0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ koncentrációnál már közel 40 %).

Srivastava és Jaiswal (1988) munkájukban szintén leírták a kadmium telelőrügy képződést indukáló hatását 10 napos kezelések során. Nálunk a kezelések 5. napjától kezdve már láthatóak voltak a képződő telelőrügyek, vagyis a merisztémák működése pár nap alatt átkapcsol, akár csak a foszfáthiány (3 nap, Appenroth 2002), vagy az abszcizinsav kezelés (4 nap, Smart et al. 1995) esetében.

A Cd indukált telelőrügy képződést két mechanizmus magyarázhatja:

- Az egyik az ásványi tápanyagok, különösen a foszfát felvételében bekövetkező zavar, mely jól ismert kiváltó oka a telelőrügyek képződésének (Appenroth 2002). A kadmiumról ismert, hogy gátolja a foszfát felvételét a növényekben (Das et al. 1997).
- Más abiotikus stresszfactorokhoz hasonlóan a nehézfémek is befolyásolják a növények hormonális szabályozását (Manara 2012). A nehézfém-kezelések bizonyos hormonok fokozott szintézisét (abszcizinsav, etilén, szalicilsav) és a citokininek csökkenő koncentrációját eredményezhetik, mely a növények szenescenciáját okozhatja. A *S. polyrhiza* esetében az abszcizinsav és a citokininek koncentrációjának aránya szabályozhatja a telelőrügyek képződését (Smart és Trewavas 1983, Smart et al. 1995).

A *S. polyrhiza*-t kedvező tulajdonságai miatt széles körben alkalmazzák. A környezetbe kerülő mérgező anyagok által kiváltott telelőrügy képződés specifikus marker lehet az ökotoxikológiai vizsgálatokban az egyes anyagok hatásainak a jellemzésekor, de a faj alkalmazását is befolyásolhatja, például a bioremediációban. Bioremediációs alkalmazásokban a gyorsan képződő biomasszát használják ki a szennyező anyagok eltávolítására, ilyen esetekben, ha valamilyen jelenlévő anyag hatására a merisztémák új szártagok helyett telelőrügyeket képeznek, az a biomassza növekedési sebességét, és ezzel a bioremediáció hatékonyságát is csökkenti. Emiatt célszerű lehet minél alaposabban megvizsgálni, mely anyagok, és pontosan milyen mechanizmuson keresztül válthatják ki a telelőrügyek képződését.

6.3. A telelőrügyek vizsgálata

A *S. polyrhiza* telelőrügyek felúszásának hátterében a szénhidrátlebontás során képződő CO_2 áll (Jacobs 1947), így a felúszás sebességét alapvetően a szénhidrátot lebontó enzimrendszer, illetve az azt szabályozó fitokróm rendszer működése határozza meg. Az általunk kapott eredmények alapján a 100 mg l^{-1} koncentrációjú nikkel-kezelések

befolyásolták a telelőrügyek aktiválódását, lassították azt. Kadmium kezeléseket követően már 1 mg l^{-1} koncentráció hatására megfigyelhető volt ez a gátló hatás, ami a növekvő kadmium koncentráció hatására fokozódott.

Eredményeink szerint a kadmium és a nikkel által a telelőrügyek aktiválódására kifejtett késleltető hatás az alkalmazott koncentrációkban csak átmenetinek tekinthető, a telelőrügyek mortalitása nem nőtt érdemben. Még az erősebb toxikus hatást okozó kadmium kezeléseknél is a telelőrügyeknek közel 100%-a a felszínre emelkedett 96 óra elteltével.

A gátlás ideiglenes jellegét jelzik a kihajtás után mért ramet/telelőrügy és ezzel összhangban, az asszimiláló levélfelület/telelőrügy arányok is, ahol nikkel esetében csak annál a koncentrációnál mértünk a kontrollnál alacsonyabb értékeket, ahol a felúszás is késleltetett volt. A kihajtatások 4. és 7. napja közt számolt növekedési ráták azonban már azt mutatják, hogy a kihajtás után az új rametek a kontrollal megegyező sebességgel fejlődtek, és nem mutattak a nikkel-expozícióval összefüggő károsodást.

A kadmium-kezelések során, a nikkelhez hasonlóan azokban a koncentrációkban, ahol késleltetve volt a telelőrügyek aktiválódása ($1, 10, 100 \text{ mg l}^{-1}$) a kihajtatások végén is alacsonyabb rametszámot mértünk. A növekedési ráták azonban itt is azt mutatták, hogy a 10 mg l^{-1} és az azalatti koncentrációknál az első ramet kihajtása után a növekedés már zavartalan volt. A legmagasabb kadmium koncentráció (100 mg l^{-1}) esetén azonban a telelőrügyek már nem voltak képesek új rametek létrehozására.

Bár az általunk alkalmazott kísérleti összeállítással (t.i. megtört dormanciájú, de nyugalmi állapotban levő telelőrügyek kezelése, majd „optimális” körülmények közti kihajtatása) összevethető irodalmi adatokat nem találtunk, a telelőrügyek nehézfém-expozíciójának a hatásaival több korábbi munka is foglalkozik.

Xyländer et al. (1993) a *S. polyrhiza*-val végzett vizsgálatainak során a nikkel telelőrügyek kihajtására gyakorolt hatásait is vizsgálta. Eredményei alapján az alacsonyabb nikkel koncentrációkat tartalmazó tápoldatok ($50 \text{ }\mu\text{M}$ -ig, azaz $2,9 \text{ mg l}^{-1}$ -ig) serkentették a telelőrügyek csírázását. Ezt azzal magyarázták, hogy a nikkel növelheti az oldott szénhidrátok hozzáférhetőségét, melyek Ley et al. (1997) eredményei szerint is befolyásolhatják a telelőrügyek aktivációját, illetve a respirációhoz szükséges szubsztrátként a propagulumok felúszását is segítik. Emellett az alacsonyabb nikkel koncentrációk a kataláz és peroxidáz enzimek indukálásával szintén stimulálhatják a csírázást, de ez a hatás a magasabb koncentrációk esetében már eltűnik, és a telelőrügyek kihajtási rátája jelentősen csökken.

Srivastava et al. (1988) munkájuk során a kadmium-kezelések hatásait mérték fel a *S. polyrhiza* életmenetére, többek közt a telelőrügyekre is. Eredményeik alapján a *S. polyrhiza* L.

telelőrügyek már 20 mg l^{-1} Cd jelenlétében sem voltak képesek új szártagok létrehozására. Ezt az általunk elvégzett vizsgálatok eredményeivel összevetve megállapítható, hogy a kadmium ebben a koncentráció-tartományban már nem csak közvetlenül, a kihajtás során képes gátolni az új szártagok létrehozását, hanem akár a kihajtást megelőző nyugalmi állapotban is bekövetkezhetnek a károsodások.

A vizsgálataink során a telelőrügyek és az aktív szártagok esetében is azt tapasztaltuk, hogy a kadmium jóval erősebben gátolta a növekedést, mint a nikkel. A kadmium-kezelések hatására mind a kifejlett növényeknél, mind pedig a telelőrügyeknél, már alacsonyabb koncentrációkban jelentkeztek a negatív hatások, és volt olyan kadmium koncentráció, ahol már a nehézfém-stresszel szemben toleránsabb telelőrügyek fejlődése is gátolva volt..

A természeti környezetben, főleg az antropogén hatásoknak köszönhetően a felszíni vizek nehézfém tartalma egyre magasabb. A nikkel tartalom akár $100\text{-}200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ ($0,1\text{-}0,2 \text{ mg l}^{-1}$) is lehet (Moore és Ramamoorthy 1982), ami a kifejlett növényekre már növekedést gátló hatással volt a kísérleti körülmények között, a telelőrügyekre azonban még nem.

A kadmium gátló hatása az általunk kidolgozott tesztrendszerben a telelőrügyek esetében 1 mg l^{-1} koncentrációtól jelentkezett. Ez több nagyságrenddel meghaladja mind a kifejlett növények növekedésgátlásához szükséges ($> 0,05 \text{ mg l}^{-1}$), mind a legtöbb természetes vízterben mérhető koncentrációt ($0,001\text{-}4 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) (Prasad et al. 2001).

Az általunk alkalmazott egyhetes expozíciókkal szemben azonban természetes körülmények között a telelőrügyek sokszor több hónapig vannak kitéve a kedvezőtlen hatásoknak. A nehézfém-terhelt felszíni vizek üledékében továbbá olyan magas, az általunk alkalmazottal összevethető nehézfém-koncentrációk is kialakulhatnak (néhány tíz mg kg^{-1} -tól több száz mg kg^{-1} -ig is) (Moore és Ramamoorthy 1982, WHO 2011), amelyek eredményeink alapján már mérhető élettani hatást eredményeztek.

7. Összefoglalás

Számos vízinövényfaj életmenetében megfigyelhető, hogy a kedvezőtlen időszakok átvészelésére vegetatív propagulumokat képeznek. A bojtos békalencse (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) alkalmas modellnövény a növényélettani, ökofiziológiai, ökotoxikológiai kutatásokhoz. Életmenetének része, hogy hideg, vagy tápelem-hiány hatására kitartó képleteket, úgynevezett telelőrügyeket képez, emiatt a vegetatív propagulumok viselkedésének vizsgálatára is alkalmas tesztnövény.

Az antropogén hatások eredményeként egyre több nehézfém kerül a felszíni vizekbe. Feltételezhető, hogy szennyezett vizekben a vízfelszínen úszó növényekhez, képest a vízfénkre süllyedő, de sokáig életképes kitartó képleteknek sokkal magasabb toxinkoncentrációt, és esetleg hosszabb ideig kell elviselniük. A dormans vegetatív propagulumoknak a toxikus vegyületekkel szembeni érzékenységről mégis keveset tudunk, pedig a vizsgálatuk környezetvédelmi, ökológiai és ökofiziológiai szempontból is fontos és érdekes adatokat eredményezhetne.

Vizsgálataink során a nehézfém-kezelések által okozott stressz hatására csak a kadmium kezelt tenyészetekben tapasztaltuk, hogy a növények telelőrügyeket képeztek. A telelőrügyek megjelenésével párhuzamosan a vegetatív szártagok létrehozása lelassult, azaz kadmium hatására a kifejlett növények merisztémái újabb szártagok helyett a szélsőséges körülményeket jobban tűrő telelőrügyeket hoztak létre.

Az általunk kapott eredmények igazolták, hogy a kifejlett növények sokkal kevésbé tolerálják a nehézfém-kezeléseket, mint a telelőrügyek. Ezek a propagulumok lassabb anyagcseréjüknek is köszönhetően képesek erősebb stressz-hatásoknak is ellenállni, így valóban hatékony stressz elkerülési stratégiát jelentenek szennyező anyagokkal szemben is. A magasabb koncentrációjú nehézfém-kezelések azonban a telelőrügyek életműködését is befolyásolták. Ez a hatás mind a lassabb aktiválódásában (felszínre való felúszás), mind az ebből következő késleltetett kihajtásban (kevesebb és kisebb új ramet adott idő alatt) megfigyelhető volt.

A fenti negatív hatások az általunk kidolgozott tesztrendszerben a telelőrügyek felúszásában, aktiválódásában csak a legmagasabb, 100 mg l⁻¹ nikkel koncentráció esetében jelentkeztek, míg a kadmium gátló hatása már 1 mg l⁻¹ koncentrációtól észlelhető volt. Azonban mind a két érték több nagyságrenddel meghaladja mind a kifejlett növények

növekedésgátlásához szükséges ($> 0,175 \text{ mg Ni}$ és $> 0,05 \text{ mg Cd l}^{-1}$), mind a legtöbb természetes víztérben mérhető koncentrációkat.

A kihajtás után a nikkel esetében, már nem tapasztaltunk eltérést a kontroll növekedési rátákkal összevetve, azaz hosszú-távú negatív hatást már nem gyakorolt a korábbi nikkel-expozíció a bojtos békalencse telelőrügyekre. A kadmium-kezelések esetében a telelőrügyek kihajtása után a gátló hatás, a nikkel-kezelésekhez hasonlóan, a $<100 \text{ mg l}^{-1}$ kadmium koncentrációk alkalmazásakor megszűnt, és az új rametek képződése már zavartalan sebességgel zajlott. Csak a legmagasabb, 100 mg l^{-1} Cd-koncentrációnál mutattak eltérést a növekedési ráta értékei az újonnan létrehozott szártagok alapján a kontrollhoz viszonyítva.

Az elmúlt 15 évben Magyarország területén két olyan ipari katasztrófa is bekövetkezett, amelyek a növények nyugalmi periódusában érintették közvetlenül a felszíni vizeinket. Mind a Szamost és a Tiszát ért cianid- és nehézfém szennyezés 2000 januárjában, mind pedig a Torna-patakot és a Marcalt ért vörösiszap-katasztrófa 2010 októberében nehézfém-tartalmú vegyületek környezetbe kerülésével járt, melyek jelentős része a felszíni vizek üledékét „gazdagította”. Ezek mellett számos olyan, a rendszerváltást megelőzően keletkezett kockázati tényező is van az ország területén (pl. az ércbányászat és a nehézipar visszamaradt hulladékai), amelyek hasonló veszélyt jelenthetnek felszíni vizeinkre.

Mivel a vízinövények jelentős része az életciklusának egy hosszabb-rövidebb szakaszát az üledékfázissal közvetlenül érintkezve tölti el, a várható kedvezőtlen környezeti hatások felmérésében a hagyományosan alkalmazott ökotoxikológiai tesztrendszerek nem nyújtanak érdemi információt. Ezért a vegetatív propagulumokkal végzett vizsgálatok fontos kiegészítő adatokkal szolgálhatnak.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Dr. Mészáros Ilona egyetemi docensnek és Dr. Oláh Viktor egyetemi adjunktusnak a szakirodalom és az eredmények feldolgozása, értékelése során adott tanácsaikért, segítségükért, valamint a DE TTK Növényteni Tanszék minden dolgozójának és szakdolgozójának a laboratóriumi munka során tanúsított segítségükért.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program-Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt és a Nemzeti Tehetség Program NTP-FTNYT-MPA-12-027 számú, "Diószegi Nyári Iskola 2013" című pályázat keretei között valósult meg.

9. Irodalomjegyzék

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., Ram, S. J., (2004): Image processing with ImageJ. Biophotonics International, 11: 36-42
- Appenroth, K. J. (2013): Formation and germination of turions in the duckweed *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae), The Second International Conference on Duckweed Research and Application, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, 2013. August 21-24, <http://duckweed2013.rutgers.edu>
- Appenroth, K. J., Krech, K., Keresztes, Á., Fischer, W., Koloczek, H. (2009): Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation, Chemosphere, 78: 216-233
- Appenroth, K. J. (2002): Co-action of temperature and phosphate in inducing turion formation in *Spirodela polyrhiza* (Great duckweed), Plant Cell and Environment 25: 1079-1085
- Appenroth, K. J., Bergfeld R. (1993): Photophysiology of turion germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden, XI. Structural changes during red light induced responses, Journal of Plant Physiology, 141: 583-588
- Appenroth, K. J., Hertel W., Jungnickel F., Augsten H. (1989): Influence of nutrient deficiency and light on turion formation in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden. Biochemie und Physiologia der Pflanzen, 184: 395-403
- Armstrong, W. P. (2001): Wayne's Word Lemnaceae On-Line: 1 March 2013. <http://waynesword.palomar.edu/1wayindx.htm>
- Atri, F. R. (1987): Nickel: Elemente in der aquatischen Umwelt I. Biotische und abiotische Systeme, Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 316
- Environment Canada (2007): EPS 1/RM/37. Biological Test Method: Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor*, Second Edition
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G. R. (1997): Studies on Cadmium toxicity in plants: a review, Environmental Pollution 98: 29-36
- DalCorso, G. (2012): Heavy metal toxicity in plants, In: Furini A. (Ed.): Plants and heavy metals, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, ISBN 978-94-007-4440-0, 1-25
- Gaur, J. P., Noraho, N., Chauhan, Y. S. (1994): Relationship between heavy metal accumulation and toxicity in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. and *Azolla pinnata* R. Br, Aquatic Botany 49: 183-192

- Gruiz, K., Horváth, B., Molnár, M. (2001): Környezettoxikológia - Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára, Műegyetemi Kiadó, Budapest, ISBN 963420676X, 171
- Gyires, K., Fűrész, Zs. (2011): A farmakológia alapjai, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, ISBN 9789632263423, 1244
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001): PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, Palaeontologia Electronica, Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm, 4: 9
- Hepp, A., Oláh, V., Mészáros, I. (2013a): Rövidtávú nikkell expozíció hatásai a bojtos békalencse telelőrügyeinek túlélésére, IX. Kárpát medencei Környezettudományi Konferencia, 2013. 06. 13-15. Miskolc, Konferenciakötet, 518-527
- Hepp, A., Oláh, V., Mészáros, I. (2013b): Békalencse-fajok keményítő-felhalmozási potenciáljának vizsgálata axenikus tenyészetekben, Hidrológiai Közlöny, 93: 37-39
- Hilty, J. (2013): Illinois wildflowers, World Wide Web electronic publication. flowervisitors.info, version 06/2013
- Hu Y., Cheng H. (2013): Water pollution during China's industrial transition, Environmental Development, 8: 57-73
- Jacobs, D. I. (1947): An ecological life history of *Spirodela polyrrhiza* (greater duckweed) with emphasis on the turion phase, Ecological Monographs, 17: 437-469
- Jana, S., Chaudhury, M. A. (1982): Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals, New Phytologist, 90: 477-484
- Klimešová, J., Klimeš, L. (2007): Bud banks and their role in vegetative regeneration – A literature review and proposal for simple classification and assessment, Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 8: 115-129
- Fodor F., Zsoldos F. (2007): A növények ásványos táplálkozása, In: Láng F. (Ed.) Növényélettan, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, ISBN 9634635679, 119-177
- Les, D. H., Crawford, D. J., Landolt, E., Gabel, J. D., Kimball, R. T. (2002): Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family, Systematic Botany, 27: 221-240
- Ley, S., Dölger, K., Appenroth, K. J., (1997): Carbohydrate metabolism as a possible physiological modulator of dormancy in turions of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden, Plant Science, 129: 1-7
- Manara, A., (2012): Plant responses to heavy metal toxicity, In: Furini, A. (ed.), Plants and heavy metals, Springer Verlag, Dordrecht - Heidelberg - New York – London, Springer Briefs in Biometals, 27-53

- Moore, J. W., Ramamoorthy, S., (1982): Heavy metals in natural waters - Applied monitoring and impact assessment. Springer-Verlag, New York/ Berlin, 161-181
- Naumann, B., Eberius M., Appenroth K. J., (2007): Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St., Journal of Plant Physiology, 164: 1656-1664
- Newton, R. J., Shelton, D. R., Disharoon, S., Duffey, J. E. (1978): Turion formation and germination in *Spirodela polyrrhiza*, American Journal of Botany, 65: 421-428
- OECD (1998): Draft OECD test guideline 221 – Lemna growth inhibition test
- Oláh, V., Lakatos, Gy., Bertók, Cs., Kanalas, P., Szöllősi, E., Kis, J., Mészáros, I. (2010): Short-term chromium (VI) stress induces different photosynthetic responses in two duckweed species, *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. Photosynthetica, 48: 513-520
- Oláh, V., Tóth, GY. D., Szöllősi, E., Kiss, T. (2008): Comparative study on sensitivity of different physiological properties of *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden to Cr (VI) treatments, Acta Biologica Szegediensis 52: 181-182
- Prasad, M.N.V, Malec, P., A Waloszek, Bojko, M., Strzałka K. (2001): Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. Plant Science, 161: 881-889
- Smart, C. C. (1996.): Molecular analysis of turion formation in *Spirodela polyrrhiza*: a model system for dormant bud induction, in: G. A. Lang (Ed.), Plant Dormancy: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, CAB International, Oxon, UK, 269–281
- Srivastava, A., Jaiswal, V. S. (1988): Effect of Cadmium on turion formation and germination of *Spirodela polyrrhiza* L., Journal of Plant Physiology, 134: 385-387
- Susplugas, S., Srivastava, A., Strasser, R. J. (2000): Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrrhiza*: Effect of chromate, Journal of Plant Physiology 157: 503-512
- WHO (2011): Cadmium in drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, WHO/SDE/WSH/03.04/80/Rev/1
- Xyländer, M., Augusten, H., Appenroth, K. J. (1993): Influence of nickel on the life cycle of the duckweed *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden, Journal of Plant Physiology, 142: 208-213